

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 11 月 28 日 (28.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/095408 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/551, 33/553
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04661
(22) 国際出願日: 2002 年 5 月 14 日 (14.05.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2001-156086 2001 年 5 月 24 日 (24.05.2001) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋
鋼板株式会社 (TOYO KOHAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 Tokyo (JP).
和光純薬工業株式会社 (WOKO PURE CHEMICAL

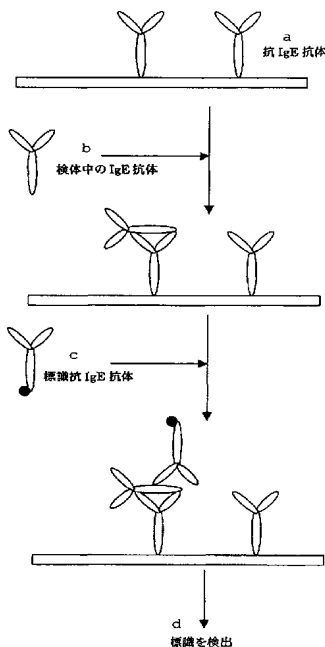
INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒540-8605 大阪府大阪
市中央区道修町三丁目1番2号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丹花 通文
(TANGA, Michifumi) [JP/JP]; 〒744-8611 山口県下松
市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社 技術研究
所内 Yamaguchi (JP). 岡村 浩 (OKAMURA, Hiroshi)
[JP/JP]; 〒744-8611 山口県下松市東豊井1296番地の
1 東洋鋼板株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP). 高
木 研一 (TAKAGI, Kenichi) [JP/JP]; 〒744-8611 山口県
下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社 技術
研究所内 Yamaguchi (JP). 天野 誠 (AMANO, Makoto)
[JP/JP]; 〒661-0963 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和
光純薬工業株式会社 大阪研究所内 Hyogo (JP). 黒澤
竜雄 (KUROSAWA, Tatsuo) [JP/JP]; 〒661-0963 兵庫

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SUPPORT CARRYING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE IMMOBILIZED THEREON AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, IMMOBILIZED PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, METHOD OF ANALYZING COMPONENT IN SAMPLE AND KIT FOR ANALYZING COMPONENT IN SAMPLE

(54) 発明の名称: 生理活性物質固定化担体及びその製造方法、固定化生理活性物質、試料中の対象成分分析方法、並びに試料中の対象成分分析用キット



(57) Abstract: It is intended to provide a support showing a high immobilization efficiency on which a physiologically active substance can be immobilized at a high density; a method of efficiently analyzing a biological component by using the immobilization support; and a kit for the analysis. A support for immobilizing a physiologically active substance which comprises a support having a carbon, metallic or a semi-metallic carbon compound layer carrying the physiologically active substance formed on the surface thereof; a process for producing the support for immobilizing a physiologically active substance characterized by bringing a support having a carbon, metallic or a semi-metallic carbon compound layer having functional group into contact with the physiologically active substance; a method of analyzing a component in a sample by using the support; and a kit for analyzing a component in a sample which contains the above support.

[続葉有]



WO 02/095408 A1



県 尼崎市 高田町6番1号 和光純薬工業株式会社 大阪
研究所内 Hyogo (JP).

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許

(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

生理活性物質を高密度に固定化することができ、固定化効率が高い担体、該固定化担体を用いて効率良く生体成分を分析する方法、及び前記分析のためのキットを提供することを目的とする。生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体、官能基を有する炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成された担体と、生理活性物質とを接触させることを特徴とする、生理活性物質固定化担体の製造方法、当該担体を用いて試料中の対象成分を分析する方法、及び、当該担体を含んでなる試料中の対象成分分析用キット。

明 細 書

生理活性物質固定化担体及びその製造方法、固定化生理活性物質、試料中の対象成分分析方法、並びに試料中の対象成分分析用キット

技術分野

本発明は、生理活性物質固定化担体、前記担体の製造方法、担体上に固定化された生理活性物質、前記担体を用いて試料中の対象成分を分析する方法、並びに前記担体を含む試料中の対象成分分析用キットを提供するものである。

なお、本発明において生理活性物質とは、生体に特有の作用を及ぼす物質又は生体由来タンパク若しくはペプチド等をいう。

背景技術

酵素、抗体等の生理活性物質は、特定の物質に対し高い選択性を有しているものが多く、このような性質を利用して特定の生体成分等を高精度に検出するために利用されている。特に、目的物質と反応する抗体を適当な固相（担体）に固定した後検体を接触させ、さらに目的物質と特異的に結合する標識抗体と反応させて目的物質の測定を行うイムノアッセイ法は、免疫検査において多用されている。

しかしながら、タンパク質や糖質等の生理活性物質を、担体へ強固で効率よく固定化することは、タンパク質や糖質等の表面電荷が様々であること等に起因して非常に困難であった。

従来より、タンパク質等の生理活性物質をスライドガラスやポリアクリルアミドゲル等の担体の上に固定化する方法、並びに当該固定化担体を用いて試料中の抗原を当該担体状の抗体と結合させ高効率（High-throughput）で検出する方法について、BioTechniques 27, 778-788 (1999)、Biosensors & Bioelectronics Vol.

13, No.3-4, pp. 407-415, 1998、Clin. Chem. 44:9, 2036-2043 (1998)、Clin. Chem. Acta (1990) 194 (1)、Anal. Chem. 1999, 71, 3845-3852、J. Immunol. Methods, 136 (1991) , 239-246、Anal. Biochem. 278, 123-131 (2000)、J. Immunol. Methods. 99 (1987) 107-112、Anal. Biochem. 250, 203-211 (1997)、Science Vol. 289, 1760-1763) 等の報告がある。

しかし、これらの報告の方法では、担体に抗体を高密度に固定化することができず、大量の抗体を必要とする割には固定化の効率が低いという問題があった。

また、アレルギーの原因（アレルゲン）を同定するため、アレルギーの発現によって、当該アレルギーの原因であるアレルゲンと特異的に結合する I g E が産生されることを利用して、I g E を検査する方法が行われており、患者の血清中の I g E をアレルゲンと反応させて、標識した抗 I g E 抗体で検出する方法が実用化されている。

具体的には、試料中の I g E と、スライドガラス上に固定化された抗ヒト I g E 抗体とを反応させた後、更に酵素標識した抗ヒト I g E 抗体を反応させて、抗ヒト I g E 抗体－I g E－酵素標識抗ヒト I g E 抗体複合体を生成させ、当該複合体中の標識を検出する方法 (Methods in enzymology Vol. 184 501-507, 1990)、アレルゲンをろ紙に結合して、これに血清を反応させ、ウミホタル由来のルシフェラーゼでラベルした抗 I g E 抗体で検出する方法（特開平 5－113443 号公報）、アフィニティーカラムを使用する方法（特表平 5－508220 号公報）、抗 I g E 抗体を 2 官能性の試薬によりポリスチレンプレートやガラス繊維フィルターなどの固相支持体に固定する方法（特表平 8－509064 号公報）などがある。

しかし、これらの報告の方法でも、担体に各種アレルゲンや抗 I g E 抗体を高密度に固定化することができず、大量の抗体を必要とする割には固定化の効率が低いという問題があった。

本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、生理活性物質を高密度に固定化することができ、固定化効率が高い生理活性物質固定化担体、該固定化担体の製造方法、該固定化担体を用いて効率良く試料中の対象成分を分析する方法、及び前記分析のためのキットを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは上記目的を達成すべく検討を行った結果、生理活性物質を固定化するための担体として炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体を採用すると高密度に官能基を配位することが可能となり、この官能基に生理活性物質の官能基を結合させて固定することができるので、固定化の効率が向上し、該生理活性物質固定化担体を用いた試料中の対象成分の分析の効率化が可能となることを見出して本発明に至った。

すなわち、請求項 1 記載の発明は、生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が担体表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を提供するものである。

生理活性物質の担体表面への固定化は、自体公知の固定化方法、例えば物理的に吸着させて固定化する方法或いは化学的結合により固定化する方法等を利用すればよいが、請求項 2 に記載するように、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基を介して固定されていることが好ましく、特に、請求項 3 に記載するように、生理活性物質が有する官能基と炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基との結合により、担体表面に固定化されていることが好ましい。

この場合において、請求項 4 に記載されているように、生理活性物質が有する官能基又は／及び炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基が、水酸基、カルボキシル基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基、アミノフェニル基及びエポキシ基からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のもので

あることが好ましい。

また、生理活性物質は、請求項 5 に記載するように、生体に特有の作用を及ぼす物質又は生体由来タンパク或いはペプチドであり、特に、請求項 6 に記載するように、抗原又は／及び抗体が好ましい。中でも、生理活性物質が、請求項 7 に記載するように、腫瘍マーカー、ホルモン、環境ホルモン、微生物由来タンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原、レセプター、リガンド、アレルゲン、免疫グロブリン、レクチン、糖鎖、脂質、リボ多糖及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものであることが特に好ましい。

具体的には、請求項 8 に記載するように、生理活性物質が、アレルゲン、免疫グロブリン、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものであることが好ましい。

更に、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物は、請求項 9 及び 10 に記載するように、結晶性炭素又は／及び非晶性炭素からなるものが好ましく、より具体的には、請求項 11 に記載するように、結晶性炭素はダイヤモンド又はダイヤモンドライクカーボンが、また、請求項 12 に記載するように、非晶性炭素はグラファイト又は非晶性カーボンが好ましい。これらの中でも、結晶性炭素、特に、ダイヤモンドが特に好ましい。

請求項 13 に記載の発明は、官能基を有する炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成された担体と、生理活性物質とを接触させることを特徴とする、生理活性物質固定化担体の製造方法を提供するものである。

より具体的には、請求項 14 に記載するように、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成された担体表面に官能基を導入し、次いでこれと生理活性物質とを接触させることが好ましい。

この場合において、当該担体表面に導入する官能基は、請求項 15 に記載するように、水酸基、カルボキシル基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール

基、アミノ基、アミノフェニル基及びエポキシ基からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものであることが好ましい。

請求項 16 記載の発明は、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されている担体上に固定化されてなる生理活性物質を提供するものである。

請求項 17 記載の発明は、請求項 1～12 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を用いることを特徴とする、試料中の対象成分の分析方法を提供するものである。

より具体的には、請求項 17 に記載するように、生理活性物質固定化担体と対象成分を含有する試料とを接触させて生成した担体に固定化された生理活性物質と試料中の対象成分との複合体を分析するものである。

ここで担体表面に固定化された生理活性物質は、請求項 19 に記載するように、抗原又は抗体の何れかであり、対象成分が当該生理活性物質に対する抗原又は抗体であることが好ましく、より好ましくは、当該抗原又は抗体は、請求項 20 に記載するように、腫瘍マーカー、ホルモン、環境ホルモン、微生物由来タンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原、レセプター、リガンド、アレルゲン、免疫グロブリン、レクチン、糖鎖、脂質、リボ多糖及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものである。中でも、抗原又は抗体は、請求項 21 に記載するように、アレルゲン、免疫グロブリン、レクチン、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものであることが特に好ましい。

請求項 22 記載の発明は、請求項 1～11 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を含んでなる対象成分分析用キットを提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の分析方法による IgE の分析を示す模式図である。図 2 は、本発明の分析方法による特定のアレルゲンに対する IgE の分析を示す模式図で

ある。図3は、実施例. 1で得られたI g E分析の結果を示す図である。図4は、実施例. 2で得られた陰性血清を検体として用いた場合のアレルゲン分析の結果を示す図である。図5は、実施例. 2で得られたスギ陽性血清を検体として用いた場合のアレルゲン分析の結果を示す図である。図6は、実施例. 2で得られたダニ陽性血清を検体として用いた場合のアレルゲン分析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

まず、請求項1記載の発明の生理活性物質固定化担体について説明する。

請求項1記載の本発明の生理活性物質固定化担体は、生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が担体表面に形成されている担体からなることを特徴とする。

生理活性物質とは、請求項5に記載するように、生体に特有の作用を及ぼす物質若しくは生体由来タンパク或いはペプチドであり、具体的には、例えばタンパク、タンパク誘導体、ペプチド、ペプチド誘導体、糖、糖誘導体、脂質、脂質誘導体等である。より具体的には、請求項6に記載するように、抗原又は／及び抗体が、後述するように抗原抗体反応により生体成分を正確に分析できるので、好ましい。中でも、請求項7に記載するように、腫瘍マーカー（例えばAFP、PSA、CEA、PGI、PGII等のタンパク抗原、CA19-9、PIVKA-II、CA125等の糖鎖抗原等）、ホルモン（例えばPTH、T3、T4、TSH、インシュリン、Cペプチド、LH、FSH、プロラクチン等）、環境ホルモン（例えばトリブチルスズ、ノニルフェノール、4-オクチルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等）微生物由来タンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原（例えば結核菌、肺炎球菌、ジフテリア菌、髄膜炎菌、淋

菌、ブドウ球菌、レンサ球菌、腸内細菌、大腸菌、ヘリコバクター・ピロリ等の細菌、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、炎テロウイルス、ポリオウイルス、EBウイルス、HAV、HBV、HCV、HIV、HTLV等のウイルス、例えばカンジダ、クリプトコッカス等の真菌、レプトスピラ、梅毒トレポネーマ等のスピロヘータ、クラミジア、マイコプラズマ等の微生物由来のタンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原)、レセプター (例えばエストロゲン、TSH等に対するレセプター)、リガンド (例えばエストロゲン、TSH等)、アレルゲン (例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギーの原因となる吸入性アレルゲン、例えば食物アレルゲン等。より具体的には、例えばハウスダスト、例えばコナヒョウダニ、ヤケヒョウダニ等のダニ類、例えばスギ、ヒノキ、スズメノヒエ、ブタクサ、オオアワガエリ、ハルガヤ、ライムギ等の花粉、例えばネコ、イヌ、カニ等の動物、例えば米、卵白等の食物、真菌、昆虫、木材、薬剤、化学物質等に由来するアレルゲン)、免疫グロブリン (例えばIgG, IgM, IgA, IgE, IgD, これらの分解産物等)、レクチン (例えばコンカナバリンA, レンズマメレクチン, インゲンマメレクチン, ダツラレクチン, 小麦胚芽レクチン等)、糖鎖 (例えばABO抗原等)、脂質 (例えばコレステロール等の脂質、カルジオリピン、ホスファチジルコリン等のリン脂質、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質、リポタンパク質)、リポ多糖 (例えばエンドトキシン等) 及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた1又は2以上のものであることが特に好ましい。

尚、生理活性物質としてレセプター、リガンド、レクチン、腫瘍マーカー (糖鎖)、タンパク又はペプチド等を用いた場合には、抗原抗体反応に限らず、レセプター－アクセプター間反応、レクチン－糖鎖間反応或いはタンパク－ペプチド鎖間反応等によっても対象成分を分析し得る。

本発明の生理活性物質固定化担体を試料中の対象成分の分析に用いる場合には、

分析対象となる成分と特異的に結合する生理活性物質を適宜選択すればよい。例えば、試料中の対象成分が抗原である場合には、担体上に固定化させる生理活性物質として当該抗原に対する抗体を選択し、対象成分が抗体である場合には、当該抗体に対する抗原或いは当該抗体に対する抗体を選択すればよい。

また、異なる２種以上の生理活性物質を選択すれば、一回の操作で、試料中に存在する２種以上の異なる対象成分を同時に分析することや未知の対象成分を分析、即ち検出乃至特定・同定することが可能となる。

尚、対象成分がレセプター、リガンド、レクチン、腫瘍マーカー（糖鎖）、タンパク又はペプチド等である場合には、レセプターに対するリガンド、リガンドに対するレセプター、レクチンに対する糖鎖、腫瘍マーカー（糖鎖）に対するレクチン、タンパクに対するペプチド鎖、ペプチドに対するタンパクを夫々生理活性物質として選択してもよい。

本発明には、例えば、請求項８に記載するように、生理活性物質としてアレルゲン、免疫グロブリン（特に I g E）、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた１又は２以上のものを固定化した生理活性物質固定化担体を用いることにより、アレルギー関連の分析を行うことができ、本発明の好ましい具体的な実施態様のひとつである。

即ち、例えばアレルゲンに対する抗体を生理活性物質として選択すれば、アレルゲンの分析（試料中のアレルゲンの存在の有無及びアレルゲンの量の分析等）を行うことができ、例えばアレルゲンを生理活性物質として選択すれば、アレルギーの原因となるアレルゲンの特定分析（どのようなアレルゲンに対してアレルギー反応を示すのか否か及びアレルギー反応の程度の分析等）を行うことができる。また、例えば抗 I g E 抗体を生理活性物質として選択すれば、試料中に存在する総 I g E 量の分析（アレルギー体質であるか否か及びその程度の分析等）を行うことができる。

尚、上記したように、異なる2種以上の生理活性物質を、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されてなる担体上に固定化する場合には、これらの生理活性物質が固定化されている位置が夫々明らかになるように、表面に適当な表示（例えば番号等を付す等）等をしておくことが好ましい。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されてなる担体に生理活性物質を固定化する量としては、使用する担体の表面積や生理活性物質の性質や種類等によって異なるため一概には言えないが、例えば生理活性物質が固定化される部分の単位面積（ cm^2 ）当たりの固定化量として、通常0.1ng～1mg、好ましくは1ng～100 μg である。

本発明で用いられる炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されてなる担体（以下、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体という。）とは、担体が炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物で表面が被覆されたものである。具体的には、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物としては、請求項9及び10に記載するように、結晶性炭素、非晶性炭素等の炭素、金属炭素化合物、半金属炭素化合物等が挙げられる。

より具体的には、結晶性炭素は、請求項11に記載するように、ダイヤモンド、ダイヤモンドライクカーボン等が好ましく、また、非晶性炭素は、請求項12に記載するように、グラファイト、非晶性カーボン等が好ましい。また、金属炭素化合物としては炭化タングステン、炭化チタニウム等が、半金属炭素化合物としては炭化珪素等が好ましい。尚、ダイヤモンドとしては、炭化合成ダイヤモンド、高圧形成ダイヤモンド、或いは天然のダイヤモンド等が挙げられる。また、結晶性炭素化合物は、その構造が単結晶体或いは多結晶体のいずれでも差し支えない。

これら炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物は、1種でも、また2種類以上組み合わせてもよい。ダイヤモンド、ダイヤモンドライクカーボン等の結晶性炭

素、グラファイト、非晶性カーボン等の非晶性炭素、なかでもダイヤモンド、ダイヤモンドライクカーボン等の結晶性炭素は、その上に生理活性物質を多く結合させることができるので、特に好ましい。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体に於ける炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物で被覆される担体は、ガラス、シリカゲル、シリコンなど各種セラミックスや、フェライト、鉄、ニッケル、コバルト等を主成分とした合金といった無機系の担体や、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ポリスチレン系誘導体、無水マレイン酸系重合体、ナイロン、ポリアクリロニトリルなどの有機合成ポリマーなど有機系の担体が挙げられる。担体の形状は粒子状、板状、棒状、膜状、ディスク状、円盤状など特に限定されない。これらのうち、安価で入手しやすい点からガラスが好ましい。

また、担体の大きさは、使用目的により異なり、特に限定されないが、 100 cm^2 以下、好ましくは 50 cm^2 以下、より好ましくは 25 cm^2 以下である。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の厚さは、一般に 1 nm 以上とすることが望ましい。好ましくは $1.5\text{ nm}\sim 1000\text{ nm}$ である。 1 nm 未満だと被覆の効果が実質上得られない。一方で、 1000 nm を超えると、実質コーティング層の極表面のみを利用することになるため、労力及び費用の点で無駄となる。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層は、公知の方法で炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物を担体に被覆させることにより製造することができる。公知の方法としては、マイクロ波プラズマCVD法、ECRCVD法、IPC法、直流スパッタリング法、ECRスパッタリング法、イオンプレーティング法、アーキイオンプレーティング法、EB蒸着法、抵抗加熱蒸着法、スラリーコーティング法などが挙げられる（特開平10-95695号公報、特開平8-296044号公報、特開平8-165576号公報、特開平8-74056号公報等）。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の表面は、平滑であっても、意図的に粗面化されていてもよい。粗面化すると、担体の表面積が増え、多量の生理活性物質を固定させるのに好都合である。

生理活性物質の担体表面への固定化は、自体公知の固定化方法、例えば物理的に吸着させて固定化する方法或いは化学的結合により固定化する方法等を利用すればよいが、請求項2に記載するように、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基を介して固定化されていることが好ましく、特に、請求項3に記載するように、生理活性物質が有する官能基と炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基との結合により固定化されていることが好ましい。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基としては、生理活性物質と直接或いはスペーサー等を介して間接的に結合し得るものであればよく、具体的には、請求項4に記載するように、水酸基、カルボキシ基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基、アミノフェニル基及びエポキシ基からなる群から選ばれた1又は2以上のものが挙げられる。

また、生理活性物質が有する官能基も同様に、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基と直接又はスペーサー等を介して間接的に結合し得るものであればよく、具体例も、上記炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が有する官能基と同様のものが挙げられる。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面への官能基の導入は、担体表面を化学修飾して活性化させることにより行うことができる。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面の化学修飾は、該担体表面に水酸基、カルボキシ基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基、アミノフェニル基、エポキシ基などの官能基を直接結合させてもよいが、例えば炭素数1以上、好ましくは1～12、より好ましくは1～6の炭化水素基等のスペーサーを介して結合させることもできる。例えば、官能基がカルボキシ

ル基の場合には、蟻酸、酢酸、プロピオン酸などのモノカルボン酸；シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸などのジカルボン酸；トリメリット酸等の多価カルボン酸等、好ましくはシュウ酸、コハク酸を炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の表面に結合させればよい。

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の表面を、化学修飾してその表面に官能基を直接或いはスペーサー等を介して導入する方法としては例えば、担体表面を酸素プラズマで酸化し、次いで水蒸気処理する方法；担体表面を水素化処理し、次いで塩素ガス中で紫外線照射して担体表面を塩素化した後、アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化する方法；担体表面を酸素プラズマで酸化し、次いで塩素化した後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化する方法；担体表面を水素化処理し、次いで塩素ガス中で紫外線照射して担体表面を塩素化した後、非水溶媒中でカルボン酸ソーダと反応させる方法等が挙げられる。

より具体的には、例えば、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の表面をカルボキシル基で化学修飾したい場合は、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面の水素化処理、塩素化処理、アミノ化処理及びカルボキシル化処理を行うことが望ましい。詳しくは、担体表面を水素化処理し、次いで塩素ガス中で紫外線照射して炭素材料等の表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、ジカルボン酸と縮合反応させる方法が望ましい。

生理活性物質の炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体への固定化は、担体表面の官能基の種類に基づき、以下のように行うことができる（例えばMethods in Enzymology Vol. 44, p. 11-148, (1976)等）。

（１）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がアミノ基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がアミノ基で化学修飾

されている場合には、生理活性物質のカルボキシル基と担体表面のアミノ基とを、N-ヒドロキシスクシンイミド、カルボキシジイミド等の縮合試薬を用いて結合させることにより生理活性物質の固定化が可能である。

また、担体表面のアミノ基にフォスゲンを作用させてイソシアネート化しておいた後、生理活性物質由来のアミノ基を結合させることにより、固定化できる。さらに、担体表面のアミノ基にチオフォスゲンを作用させてイソチオシアネート化しておいた後、生理活性物質由来のアミノ基を結合させることによっても、固定化できる。

更にまた、担体表面のアミノ基にグルタルアルデヒドを反応させ、これを生理活性物質由来のアミノ基、フェノール基と反応させることにより、固定化できる。

そして、生理活性物質が糖、糖タンパク等の糖誘導体の場合は、予め過ヨウ素酸と反応させた後、担体表面のアミノ基と反応させ、さらに水素化ホウ素ナトリウム等で還元することにより、固定化できる。

また、担体表面のアミノ基を、例えばm-マレイミドベンゾイル N-ヒドロキシサクシンイミド エステル等のマレイミド基を有する2官能性スペーサー、4-サクシンイミジルオキシカルボニル- α -(2-ピリジルジチオ)トルエン等のピリジルジチオスルフィド基を有する2官能性スペーサー等でマレイミド化或いはピリジルジチオスルフィド化した後、当該マレイミド化又はピリジルジチオスルフィド化担体と生理活性物質のチオール基とを反応させることにより固定化できる。

(2) 炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がカルボキシル基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がカルボキシル基で化学修飾されている場合は、担体表面のカルボキシル基と生理活性物質のアミノ基とをN-ヒドロキシスクシンイミドとカルボジイミド等の縮合試薬を作用させて

反応させることにより、固定化できる。また、担体表面のカルボキシル基に塩化チオニルを作用させカルボキシクロリドを形成させる。形成されたカルボキシクロリドと生理活性物質由来のアミノ基を反応させることによっても固定化できる。

さらに、担体表面のカルボキシル基に塩酸とメタノールを加え反応させ、次いで、ヒドラジンを加え反応させ、ヒドラジドを形成させ、さらに、ヒドラジドに亜硝酸ナトリウムと塩酸を加えアシルアジド化することによって担体表面を活性化させた後、これを生理活性物質由来のアミノ、チオール、水酸基と反応させることにより、固定化できる。

また、担体表面のカルボキシル基から無水物を形成させ、これを生理活性物質由来のアミノ基と反応（脱水縮合）させることにより、固定化できる。

（３）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基が水酸基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面が水酸基で化学修飾されている場合には、担体表面の水酸基に塩化シアニルを作用させてトリアジニル誘導体を形成させ、生理活性物質由来のアミノ基を結合させることにより、固定化できる。

また、担体表面が水酸基で化学修飾されてなる場合には、担体表面の水酸基をアセチル化した後臭素化し、NaIで臭素と沃素を置換することによって担体表面を活性化し、これに生理活性物質のアミノ基、チオール基又は水酸基と反応させることによっても、固定化できる。

さらにまた、担体表面の水酸基に臭化シアンを作用させ活性化し、これを生理活性物質由来のアミノ基と共有結合させることによっても、固定化できる。

（４）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がエポキシ基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がエポキシ基で化学修

飾されている場合は、これを生理活性物質由来の水酸基（チロシン、セリン等に由来するもの）、アミノ基又はチオール基と反応させることにより、固定化できる。

（５）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基が硫酸基（スルホ基）の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がスルホ基で化学修飾されている場合には、担体表面のスルホ基に塩化スルホン酸を反応させてスルホンクロライドを形成させ、生理活性物質由来のアミノ基、イミダゾール基、チオール基、フェノール基等と反応させることにより、固定化することができる。

（６）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がアミノフェニル基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がアミノフェニル基で化学修飾されている場合には、担体表面のアミノフェニル基を亜硝酸ナトリウムと塩酸で活性化しておいて、これを生理活性物質由来のアミノ基、チオール基、フェノール基、イミダゾール基、グアニジノ基と反応させるといったジアゾニウムカップリング法を利用しても固定化できる。

（７）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がシアノ基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がシアノ基で化学修飾されている場合は、当該シアノ基を酸触媒の存在下で加水分解し、これをカルボキシル基に変換した後、上記（２）と同様にすれば固定化できる。

（８）炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がニトロ基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がニトロ基で修飾されている場合は、リチウムアルミニウムハイドライド等の還元剤で還元し、これをアミノ基に変換した後、上記（１）と同様にすれば固定化できる。

(9) 炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体の官能基がチオール基の場合

炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面がチオール基で化学修飾されている場合は、生理活性物質のアミノ基を、例えばm-マレイミドベンゾイル N-ヒドロキシサクシンイミド エステル等のマレイミド基を有する2官能性スペーサー、4-サクシンイミジルオキシカルボニル- α -(2-ピリジルジチオ) トルエン等のピリジルジチオスルフィド基を有する2官能性スペーサー等でマレイミド化或いはピリジルジチオスルフィド化した後、当該マレイミド化又はピリジルジチオスルフィド化生理活性物質と担体表面のチオール基とを反応させることにより固定化できる。

また、上記した如き2官能性スペーサーの代わりに、ビス マレイミドヘキサシ、1, 4-ジ-[3'-2'-ピリジルジチオ(プロピオンアミド)] ブタン等の2官能性スペーサーを用いて、担体表面のチオール基と生理活性物質のチオール基とを反応させることにより、固定化できる。

尚、上記方法は、互いに結合させる官能基の組み合わせが同じであれば、担体表面の官能基と生理活性物質由来の官能基が逆であっても、場合によっては適用可能である。

本発明に係る生理活性物質がその表面に固定化されている炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体は、非特異的な吸着による分析への影響を防止するために、いわゆるブロッキング処理、より具体的には、例えばアルブミン、グロブリン、カゼイン、ポリビニルアルコール、界面活性剤、シランカップリング剤、チタンカップリング剤、アルミカップリング剤等のブロッキング剤によるブロッキング処理を施しておくことが望ましい。また、本発明に係る当該担体は、例えば乾燥処理、凍結処理、凍結乾燥処理等を施した状態、或いは適当な緩衝液に浸漬させた状態等、多種多様の状

態で保存し得る。

当該緩衝液としては、通常この分野で用いられている例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられ、また、このような緩衝液中には、例えばアルブミン、グロブリン、水溶性ゼラチン、ポリエチレングリコール等の安定化剤、界面活性剤、糖類等を含有させておいてもよい。

尚、異なる２種以上の生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を製造するには、生理活性物質として異なる２種以上のものを適宜使用する以外は、上記した方法に準じて行えばよい。

次に、本発明の表面に生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成された生理活性物質固定化担体の製造方法について説明する。

即ち、請求項１３に記載するように、その表面に官能基を有する炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成された担体と、生理活性物質とを接触させた後、前述したように自体公知の固定化方法、例えば物理的に吸着させて固定化する方法（物理的結合方法）等を利用して当該担体表面に生理活性物質を固定化し、目的の生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を製造することができる。

なかでも、当該担体と生理活性物質とをより強固に結合し得るので、その表面に官能基を有する炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成された担体と、生理活性物質とを接触させ、化学的結合により炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基を介して生理活性物質を担体表面に固定することが好ましく（化学的結合方法）、特に、生理活性物質が有する官能基と炭素乃至は金属又は半

金属炭素化合物層の官能基とを化学的結合により結合させて生理活性物質を担体表面に固定することが好ましい。

尚、本発明の製造方法に於いて、生理活性物質、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物並びに担体等の具体例及び好ましい態様、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成方法等は先に述べた通りである。

また、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層に導入される官能基、並びに結合させる生理活性物質中の官能基の種類や組み合わせも前述の通りであり、生理活性物質又は炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基と直接或いはスペーサー等を介して間接的に結合し得るものであればよく、具体的には、請求項 15 に記載するように、水酸基、カルボキシル基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基、アミノフェニル基及びエポキシ基からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものが挙げられる。

上記本発明の製造方法は、具体的には例えば以下の如くして実施すればよい。

即ち、物理的結合方法を利用する場合には、例えば、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体に、生理活性物質を含有する溶液を、例えば塗布、滴下又は噴霧等するか、若しくは当該溶液中に当該担体を浸漬するか、或いは市販のスタンピング装置を用いる方法（例えば、日本レーザー電子（株）等から販売されているスタンピング装置を用いる方法等）等により、当該担体と生理活性物質とを接触させた後、これを乾燥して物理的吸着により担体表面に生理活性物質を固定化し、目的の生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を得ることができる。

また、化学的結合方法を利用する場合には、例えば、その表面に官能基を有する炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体に、生理活性物質を含有する溶液を、例えば塗布、滴下又は噴霧等するか、若しくは当該溶液中に当該担体

を浸漬するか、或いは市販のスタンピング装置を用いる方法（例えば、日本レーザー電子（株）等から販売されているスタンピング装置を用いる方法等）等により、当該担体と生理活性物質とを接触させた後、自体公知の化学的結合方法に従って当該担体の官能基と生理活性物質、具体的には生理活性物質の官能基とを反応させて化学的に結合させ、担体表面に生理活性物質を固定化し、目的の生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を得ることができる。

尚、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体が生理活性物質を結合させるための適当な官能基を有さない場合等に於いては、請求項 1 4 に記載するように、予め炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面に適当な官能基を導入した後、上記したように当該担体と、生理活性物質とを接触させればよい。

上記方法に於いて、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成担体表面への官能基の導入方法は、先に述べた通りである。

また、上記方法に於いて、生理活性物質を含有させる溶液としては、通常この分野で用いられている例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。また、固定化する際の溶液中の生理活性物質濃度としては、使用する生理活性物質の性質や種類等により一概には言えないが、通常 $1 \text{ ng/ml} \sim 1000 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $1 \mu\text{g/ml} \sim 10 \text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{g/ml} \sim 2 \text{ mg/ml}$ である。このような生理活性物質含有溶液を用いて先に述べた濃度範囲となるように担体表面に生理活性物質が固定化される。

また、請求項 1 6 記載の発明は、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されている担体上に固定化されてなることを特徴とする生理活性物質に関するものである。

このような生理活性物質は従来知られておらず、このようにすることにより、例えば試料中の当該生理活性物質と結合する性質を有する対象成分を高感度に且つ高精度に測定し得るようになる。

尚、生理活性物質、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物並びに担体等の具体例及び好ましい態様、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層形成方法、固定化方法等は先に述べた通りである。

上記方法により生理活性物質がその表面に固定化されている、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されている担体を得た後、これを通常この分野で行われているブロッキング処理、即ち、当該担体を、更に例えばアルブミン、グロブリン、カゼイン、ポリビニルアルコール、界面活性剤、シランカップリング剤、チタンカップリング剤、アルミカップリング剤等のブロッキング剤を含有する溶液中に浸漬する処理を行うことが望ましい。

次に、請求項 17 記載の本発明の試料中の対象成分の分析方法について説明する。

請求項 17 記載の本発明の方法は、請求項 1～12 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を用いるものである。該生理活性物質固定化担体を用いることにより、試料中の対象成分を効率よく高感度且つ高精度に分析することができる。

より具体的には、請求項 18 に記載するように、先ず、請求項 1～12 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体と、対象成分を含有する試料とを接触させ、当該担体に固定化された生理活性物質と試料中の当該対象成分との複合体を生成させる。次いで当該複合体を分析することにより試料中の対象成分の分析を行えばよい。

また、本発明の分析方法に於いて、異なる 2 種以上の生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を用いることにより、試料中の対象成分を効率

よく高感度且つ高精度に分析し得るだけでなく、一回の操作で、試料中に存在する２種以上の異なる対象成分を同時に分析することや未知の対象成分を分析（特定・同定）することも可能となる。

より具体的には、先ず、試料中に含有される各種対象成分を、生理活性物質固定化担体上に固定化された異なる２種以上の生理活性物質全てと実質上同時に接触することになるように、当該担体表面に供給し、生成される当該担体に固定化された各種生理活性物質と試料中の当該各種対象成分との複合体を分析することにより、試料中の各種対象成分の分析を行えばよい。

ここでいう対象成分とは、例えば抗原抗体反応、レセプターーリガンド間反応、レクチンー糖鎖間反応、タンパクーペプチド鎖間反応等によって生理活性物質と特異的に結合する能力を有するものである。より具体的には、前述した如き生理活性物質と同様のものが挙げられ、また、生理活性物質と対象成分の組み合わせも先に述べた通りである。

また、試料としては、例えば血清、血漿、髄液、滑液、リンパ液等の体液、尿、糞便のような排泄物、喀たん、膿、皮膚由来物等の生体由来試料、例えば食品、飲料、水道水、海水、湖沼水、河川水、工場廃液、半導体用洗浄水、医療器具等を洗浄した後の洗浄液等の環境試料及びこれらを水や通常この分野で用いられている例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等の緩衝液等に適宜溶解させて再構成して得られた処理物等が挙げられる。

本発明の分析方法に於いて、生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体と、対象成分を含有する試料とを接触させる方法、又は試料中に含有される各種対象成分を、生理活性物質固定化担体上に固定化された異なる２種以上の生理活性物質全てと実質上同時に接触させる方法としては、当該試料を当該担体上

に滴下又は塗布等する方法、若しくは当該試料中に当該担体を浸漬する方法等が挙げられる。

上記方法に於いて、生理活性物質固定化担体に固定化された生理活性物質と試料中の当該対象成分との複合体を分析するには、通常、当該複合体に、更に、当該対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質を接触させ、生理活性物質固定化担体に固定化された生理活性物質と試料中の当該対象成分と当該標識結合物質との複合体（標識複合体）を生成させ、当該標識複合体中の標識物質を測定し、その結果に基づいて行うのが一般的である。

尚、対象成分が、例えば酵素、色素、蛍光物質、発光物質、紫外部に吸収を有する物質等何らかの方法により検出可能なものである場合等には、必ずしも上記した如き標識結合物質を用いなくても良い。また、生理活性物質固定化担体に固定化された生理活性物質と試料中の当該対象成分との複合体と、当該対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質とを接触させるには、上記した如き生理活性物質がその表面に固定化されている、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体と、対象成分を含有する試料とを接触させる方法と同様に行えばよい。

ここで、対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質は、対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有し、且つ何らかの方法により検出可能なものであり、通常は標識物質によって標識された、対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する能力を有する物質である。尚、対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する能力を有する物質は、先に述べた生理活性物質と同様のものであり、通常、対象成分或いは当該複合体に対する抗体又は抗原が一般的である。

本発明に於いて用いられる標識物質としては、酵素免疫測定法（EIA）、放

射免疫測定法 (RIA)、蛍光免疫測定法 (FIA)、ハイブリダイゼーション法等、通常この分野で用いられるものであればよく、例えばアルカリホスファターゼ (ALP)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)、パーオキシダーゼ (POD)、マイクロパーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ (GOD)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例えばクーマシーブリリアントブルーR250、メチルオレンジ等の色素、例えば ^{99m}Tc 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、等の放射性同位元素、例えばCy3、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体、ユウロピウム (Eu) 等の蛍光性物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル) オキサレート等の発光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-*t*-ブチル- α -(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-オキシノ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシル等のオキシル基を有する化合物に代表されるスピンラベル化剤としての性質を有する物質等が挙げられる。

標識物質により、対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する能力を有する物質を標識するには、通常この分野で用いられる常法、例えば自体公知のEIA、RIA、FIA或いはハイブリダイゼーション法等に於いて一般的に行われている自体公知の標識方法〔例えば、医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971；図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983；酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、宮井潔編、第3版、医学書院、1987、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル セカンド エディション、J. サムブルック、E. F. フリ

ツシュ、T. マニアティス、コールド スプリング ハーバー ラボラトリ
ー プレス等] や、アビジン（又はストレプトアビジン）とビオチンの反応
を利用した常法等何れの方法により行ってもよい。

本発明の分析方法に於いては、生成した、1 又は異なる 2 種以上の生理活性
物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成され
ている担体からなる生理活性物質固定化担体と、試料中の対象成分との複合体中
の当該対象成分、又は 1 又は異なる 2 種以上の生理活性物質が固定化された炭素
乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理
活性物質固定化担体と試料中の対象成分と当該対象成分或いは当該複合体に特異
的に結合する性質を有する標識結合物質との複合体（標識複合体）中の標識物質
の性質に基づいて検出することにより、試料中の対象成分の存在の有無を分析す
ることができる。

更に、本発明の分析方法によれば、当該複合体中の対象成分又は当該標識複合
体中の標識物質の量を、これらの性質に応じた測定方法により求め、これらの量
に基づいて、試料中の対象成分の量を定量的又は半定量的に求めることができる。

尚、得られた対象成分又は標識物質の量に基づいて、試料中の対象成分の
量を求めるには、例えば対象成分濃度既知の試料（標準品）を用いて同様の
方法により測定を行い、対象成分濃度と得られた測定値（測定された複合体
中の対象成分量又は標識複合体中の標識物質の量）との関係を示す検量線を用
いて試料中の対象成分の量を算出すればよい。

本発明の分析方法をより具体的に述べれば以下の通りである。

即ち、先ず、1 又は異なる 2 種以上の生理活性物質が固定化された炭素乃至
は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物
質固定化担体と、対象成分を含有する試料とを上記した如き方法により互いに接
触させ、当該生理活性物質と当該対象成分との複合体を生成させる。その後、当

該担体を、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液、SSC緩衝液等のハイブリダイゼーション法、免疫法等の分野で用いられる緩衝液等で洗浄し、複合体の生成に関与しなかった試料中の成分を除去する。次いで、要すれば、生成した当該複合体と、当該対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質とを接触させ、生理活性物質固定化担体に固定化された生理活性物質と試料中の対象成分と当該標識結合物質との標識複合体を生成させた後、当該担体を、上記した如き緩衝液等で洗浄して標識複合体の生成に関与しなかった遊離の標識結合物質を除去する。次いで、当該複合体中の対象成分又は当該標識複合体中の標識物質を、これらの性質に応じた所定の方法により測定し、その結果に基づいて試料中の対象成分を分析することができる。

また、上記した如き方法の他に、例えば標識物質によって標識された対象成分を用いて、これと試料中の対象成分との競合反応を利用する、いわゆる競合法によっても、試料中の対象分子を分析することができる。

即ち、先ず、1又は異なる2種以上の生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体と、対象成分を含有する試料と、標識物質により標識された対象成分とを接触させ、当該生理活性物質と当該標識された対象成分との標識複合体と、当該生理活性物質と当該対象成分との複合体を生成させる。その後、当該担体を、上記した如き緩衝液等で洗浄し、複合体の生成に関与しなかった試料中の成分及び遊離の標識された対象成分を除去する。次いで、当該標識複合体中の標識物質又は除去された遊離の標識された対象成分に結合した標識物質を、これらの性質に応じた所定の方法により測定し、その結果に基づいて試料中の対象成分を分析することができる。

ここで、標識物質による対象成分の標識方法及び生理活性物質固定化担体

と試料と標識された対象成分との接触方法は、夫々先に述べた標識物質により対象成分或いは複合体に特異的に結合する能力を有する物質を標識する方法及び生理活性物質固定化担体と対象成分を含有する試料とを接触させる方法と同様であり、それ以外については前述した通りである。

上記方法に於いて、複合体中の対象成分又は標識複合体中の標識物質を測定するには、これらの種類に応じて夫々所定の測定方法に従って行えばよい。例えば、その性質が酵素活性の場合にはE I Aやハイブリダイゼーション法等の常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、51～63頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、検出物質が放射性物質の場合にはR I Aやハイブリダイゼーション法等の常法に従い、該放射性物質の出す放射線の種類及び強さに応じて液浸型GMカウンター、液体シンチレーションカウンター、井戸型シンチレーションカウンター等の測定機器を適宜選択して使用し、測定を行えばよい（例えば医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971、生化学実験講座2 トレーサー実験法下、竹村彰祐、本庶佑、501～525頁、（株）東京化学同人、1977年2月25日発行等参照。）。また、その性質が蛍光性の場合には蛍光光度計や共焦点レーザー顕微鏡等の測定機器を用いるF I Aやハイブリダイゼーション法等の常法、例えば「図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、（株）ソフトサイエンス社、1983」、「生化学実験講座2

核酸の化学III、実吉峯郎、299～318頁、（株）東京化学同人、1977年12月15日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、その性質が発光性の場合にはフォトンカウンター等の測定機器を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、252～263頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記

載された方法に準じて測定を行えばよい。更に、その性質が紫外部に吸収を有する性質の場合には分光光度計等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよく、その性質が発色性の場合には分光光度計や顕微鏡等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよい。また、検出物質がスピンの性質を有する物質の場合には電子スピン共鳴装置を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川 常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、264～271頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて夫々測定を行えばよい。

上記の方法に於いて、対象成分或いは複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質の量は、用いられる当該標識結合物質の種類等により異なるため一概には言えないが、通常は生理活性物質固定化担体に固定化された生理活性物質の全てと結合し得る濃度以上であり、また、標識物質により標識された対象成分の量も同様に、用いられる対象成分の種類等により異なるため一概には言えないが、通常は生理活性物質固定化担体に固定化された生理活性物質の全てと結合し得る濃度以上である。

また、上記方法に於いて、反応時のpHや温度は、生理活性物質と対象成分の種類等により異なるため一概には言えないが、生理活性物質と対象成分との複合体、生理活性物質と対象成分と標識物質との標識複合体又は生理活性物質と標識対象成分との複合体が形成されるのを妨げない範囲であれば良く、pHは、通常2～10、好ましくは5～9であり、温度は、通常0～90℃、好ましくは20～80℃である。また、反応時間は、上記した如き複合体が形成されるのに要する時間が、当該複合体を形成する成分の性質等により異なるので、夫々の性質に応じ、通常数秒乃至数時間適宜反応させればよい。

本発明の分析方法に於いては、本発明に係る担体表面に固定化させる生理活性

物質として、請求項 19 に記載するように、抗原又は抗体を選択すれば、試料中に存在する、当該生理活性物質に対する抗原又は抗体を対象成分として簡便且つ高精度に分析し得る。また、請求項 20 に記載するように、腫瘍マーカー、ホルモン、環境ホルモン、微生物由来タンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原、レセプター、リガンド、アレルゲン、免疫グロブリン（特に I g E）、レクチン、糖鎖、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものを選択すれば、試料中に存在するこれら自体或いはこれら生理活性物質に対する抗体を簡便に分析し得るので有用である。

尚、生理活性物質としてレセプター、リガンド、レクチン、腫瘍マーカー（糖鎖）、タンパク又はペプチド等を選択した場合には、抗原抗体反応に限らず、レセプター—リガンド間反応、レクチン—糖鎖間反応或いはタンパク—ペプチド鎖間反応等によっても分析し得る。

更には、請求項 21 に記載するように、生理活性物質としてアレルゲン、免疫グロブリン（特に I g E）、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものを固定化した生理活性物質固定化担体を用いて本発明の分析方法を実施すれば、アレルギー関連の分析を簡便且つ高精度に行うことができるので特に有用である。

即ち、例えばアレルゲンに対する抗体を生理活性物質として用いれば、アレルゲンの分析（試料中のアレルゲンの存在の有無及びアレルゲンの量の分析）に有用であり、例えばアレルゲンを生理活性物質として用いれば、アレルギーの原因となるアレルゲンの特定分析（どのようなアレルゲンに対してアレルギー反応を示すのか否か及びアレルギー反応の程度の分析）に有用であり、また、例えば抗 I g E 抗体を生理活性物質として用いれば、試料中に存在する総 I g E 量の分析（アレルギー体質であるか否か及びその程度の分析）に有用である。

本発明の分析方法を、アレルギー関連の分析を例にとり、以下により具体的に

説明する。

(1) アレルゲンの分析

先ず、生理活性物質としてアレルゲンに対する抗体が固定化された生理活性物質固定化担体上に、対象成分（アレルゲン）を含有する試料を滴下又は塗布等するか、或いは当該試料中に当該担体を浸漬等して互いに接触させ、生理活性物質固定化担体上のアレルゲンに対する抗体とアレルゲンとの複合体を生成させる。その後、当該担体を適当な緩衝液等で洗浄し、複合体の生成に関与しなかった試料中の成分（遊離のアレルゲン等）を除去する。次いで、生成した当該複合体と、標識物質により標識されたアレルゲンに対する抗体（当該対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質）とを上記と同様にして接触させ、生理活性物質固定化担体に固定化されたアレルゲンに対する抗体とアレルゲンと標識されたアレルゲンに対する抗体との標識複合体を生成させる。その後、これを、適当な緩衝液等で洗浄して標識複合体の生成に関与しなかった遊離の標識されたアレルゲンに対する抗体を除去する。次いで、当該標識複合体中の標識物質を、前述した如き方法により測定すれば、試料中にアレルゲンが存在するの否かを分析することができる。

更に、上記方法に於いて当該標識複合体中の標識物質の量を、前述した如き方法により求め、得られた標識物質の量を、アレルゲン濃度既知の試料（標準品）を用いて同様の方法により測定を行って得られた、アレルゲン濃度と得られた測定値（測定された標識複合体中の標識物質の量）との関係を示す検量線に当てはめれば、試料中に存在するアレルゲンの量を定量又は半定量的に求めることができる。

上記方法に於いて、異なる2種以上のアレルゲンに対する抗体が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を用いてこれを行えば、一回の操作で、試料中に存

在する複数種のアレルゲンを特定・同定・定量等を行うことができるので有利である。

(2) アレルギーの原因となるアレルゲンの特定分析

先ず、生理活性物質としてアレルゲン（抗原）が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体上に、対象成分（当該アレルゲンに対する I g E）を含有する試料を滴下又は塗布等するか、或いは当該試料中に当該担体を浸漬等して互いに接触させ、担体上のアレルゲンと当該アレルゲンに対する I g E との複合体を生成させる。その後、当該担体を適当な緩衝液等で洗浄し、複合体の生成に関与しなかった試料中の成分（遊離の対象外の I g E 等）を除去する。次いで、生成した当該複合体と、標識物質により標識された抗 I g E 抗体（当該対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質）とを上記と同様にして接触させ、担体に固定化されたアレルゲンと当該アレルゲンに対する I g E と標識抗 I g E 抗体との標識複合体を生成させる。その後、これを、適当な緩衝液等で洗浄して標識複合体の生成に関与しなかった遊離の標識抗 I g E 抗体を除去する。次いで、当該標識複合体中の標識物質を、前述した如き方法により測定すれば、試料中に生理活性物質として用いた特定のアレルゲンに対する I g E が存在するのか否か、即ち、試料が由来する生体が特定のアレルゲンに対してアレルギー反応を引き起こすのか否か、更に換言すれば、アレルギーの原因となるアレルゲンを特定することができる。

更に、上記方法に於いて当該標識複合体中の標識物質の量を、前述した如き方法により求め、得られた標識物質の量を、I g E 濃度既知の試料（標準品）を用いて同様の方法により測定を行って得られた、I g E 濃度と得られた測定値（測定された標識複合体中の標識物質の量）との関係を示す検量線に当てはめれば、試料中に存在する、生理活性物質として用いたアレルゲンに対する

抗体（I g E）の量を定量又は半定量的に求めることができ、これにより、試料が由来する生体の特定のアレルゲンに対する感受性の強さの程度、即ち、当該生体が特定のアレルゲンに対してアレルギー反応を引き起こす強さの程度をも分析することができる。

尚、上記方法の概略を図1に示す。

上記方法に於いて、異なる2種以上のアレルゲンが固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を用いてこれを行えば、一回の操作で、試料中に存在する各種 I g E が反応するアレルゲンの種類（即ち、当該試料に係る生体がどのようなアレルゲンに対してアレルギー反応を引き起こすのか否か）を特定・同定することや特定・同定されたアレルゲンに対する感受性の強さの程度を分析することができるので有利である。

（3）試料中に存在する総 I g E 量の分析

先ず、生理活性物質として抗 I g E 抗体が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体上に、対象成分（I g E）を含有する試料を滴下又は塗布等するか、或いは当該試料中に当該担体を浸漬等して互いに接触させ、担体上の抗 I g E 抗体と I g E との複合体を生成させる。その後、当該担体を適当な緩衝液等で洗浄し、複合体の生成に関与しなかった試料中の成分を除去する。次いで、生成した当該複合体と、標識物質により標識された抗 I g E 抗体（当該対象成分或いは当該複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質）とを上記と同様にして接触させ、担体に固定化された抗 I g E 抗体と I g E と標識抗 I g E 抗体との標識複合体を生成させる。その後、これを、適当な緩衝液等で洗浄して標識複合体の生成に関与しなかった遊離の標識抗 I g E 抗体を除去する。次いで、当該標識複合体中の標識物質の量を、前述した如き方法により求め、得られた標識物質の量を、

I g E濃度既知の試料（標準品）を用いて同様の方法により測定を行って得られた、I g E濃度と得られた測定値（測定された標識複合体中の標識物質）との関係を示す検量線に当てはめれば、試料中に存在する総I g E量を定量又は半定量的に求めることができる。これにより、当該試料に係る生体のアレルギー全般に対する感受性の強さの程度、即ち、当該生体がアレルギー体質であるのか否か（その程度）を分析することができる。

尚、上記方法の概略を図2に示す。

上記方法に於いて、抗I g E抗体と異なる2種以上のアレルギーとが夫々同一面上に固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体を用いて、上記方法（2）と方法（3）とを同時に行えば、一回の操作で、試料中に存在するI g Eに対するアレルギーの種類（即ち、当該試料に係る生体がどのようなアレルギーに対してアレルギー反応を引き起こすのか否か）の特定・同定又は／及び特定・同定されたアレルギーに対する感受性の強さの程度の分析と同時に当該試料に係る生体のアレルギー全般に対する感受性の強さの程度（当該生体がアレルギー体質であるのか否か）の分析を行うことができるので有利である。

即ち、先ず、生理活性物質として抗I g E抗体と異なる2種以上のアレルギーとが夫々同一面上に固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体上に、対象成分（I g E）を含有する試料を滴下又は塗布等するか、或いは当該試料中に当該担体を浸漬等して互いに接触させ、担体上の各種アレルギーとI g Eとの複合体及び担体上の抗I g E抗体とI g Eとの複合体を夫々生成させる。その後、当該担体を適当な緩衝液等で洗浄し、複合体の生成に関与しなかった試料中の成分を除去する。次いで、生成した各種複合体と、標識物質により標識された抗I g E抗体とを上記と同様にして接触させ、担体に固定化されたアレルギーとI g Eと標

識抗 I g E 抗体との標識複合体と担体に固定化された抗 I g E 抗体と I g E と標識抗 I g E 抗体との標識複合体を夫々生成させる。その後、これを、適当な緩衝液等で洗浄して標識複合体の生成に関与しなかった遊離の標識抗 I g E 抗体を除去する。その後、生成した該標識複合体のうち、担体に固定化された各種アレルゲンに係る標識複合体中の夫々の標識物質を、前述した如き方法により測定すれば、生理活性物質として用いた 2 種以上のアレルゲンのうちの何れのアレルゲンに対する抗体 (I g E) が試料中に存在するの否か、即ち、試料中に存在する I g E に対するアレルゲンの種類の特定・同定、換言すれば、当該試料に係る生体がどのようなアレルゲンに対してアレルギー反応を引き起こすの否かの分析を行うことができ、また、前述した如き方法により測定された標識物質の量に基づいて、前述した如き方法により試料中に存在する特定・同定されたアレルゲンに対する抗体 (I g E) の量を定量又は半定量的に求めれば、当該試料に係る生体の当該特定・同定されたアレルゲンに対する感受性の強さの程度、即ち、当該生体が特定・同定されたアレルゲンに対してアレルギー反応を引き起こす強さの程度を分析することができる。更に、前述した如き方法により測定された標識物質の量に基づいて、前述した如き方法により試料中に存在する総 I g E 量を定量又は半定量的に求めれば、当該試料に係る生体のアレルゲン全般に対する感受性の強さの程度、即ち、当該生体がアレルギー体質であるの否か (その程度) を分析することができる。

続いて請求項 22 記載の本発明の試料中の対象成分分析用キットについて説明する。

請求項 22 記載の本発明のキットは、請求項 1 ～ 12 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を含んでなるものである。これらの生理活性物質固定化担体には、分析対象となる 1 又は 2 以上の対象成分に対応し、それぞれに特異的に結合しうる 1 又は 2 以上の生理活性物質が固定化されている。

本発明のキットに於いて、当該生理活性物質固定化担体の好ましい態様及び具体例等は、先に述べた通りである。また、本発明のキットには、当該担体の他に、上記した如きの対象成分或いは当該対象成分に係る複合体に特異的に結合する性質を有する標識結合物質を含ませることができる。

尚、本発明のキットは、上記した如き請求項 1 ～ 12 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を含んでなる以外は、上記した如き通常この分野で用いられる試薬類、例えば緩衝液（洗浄液）等の溶液、例えば被酸化性呈色試薬やカップリング剤等の発色剤、例えば標識物質が酵素である場合は、その酵素を測定するための基質、酵素反応を停止するための反応停止剤等の試薬類、対象成分からなる標準品等を含んでいてもよい。尚、このような試薬類や標準品に含まれる各種成分の使用濃度は、この分野で通常使用される濃度範囲から適宜選択すればよい。

実施例

以下、実施例により本発明を説明する。

（実施例 1）

図 1 のプロセスに従い、抗 I g E 抗体を結合したダイヤモンド被覆担体を用いて I g E の分析を行った。

1. 官能基の活性化

カルボキシル基で覆われたダイヤモンド被覆担体を、20 mM N-hydroxysuccinimide 及び 0.1 M 1-(3-(dimethylamino)propyl)3-ethylcarbodiimide を含む 0.1 M リン酸緩衝液（pH 6）に 30 分間浸漬した。浸漬終了後、滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、完全に水分が飛ぶように、ダイヤモンド被覆担体を遠心分離した。

2. 抗ヒト I g E 抗体の固定化

抗ヒト I g E 抗体を 50 mM M O P S 緩衝液 p H 7. 5 で所定濃度に調整し、上記で作成した活性化ダイヤモンド被覆担体に、日本レーザー電子製 G T - M A S S スタンピングマシーンをを用いてスポッティングした。

スポッティング終了後、あらかじめ、65℃にした50%ホルムアミドを含む加湿チャンバー内で1時間インキュベーションを行った。

3. ブロッキング処理

上記2で得た I g E 抗体固定化ダイヤモンド被覆担体に、2% 牛血清アルブミンを含む50 mM M O P S 緩衝液 (p H 7. 5) で一昼夜室温でブロッキングを行った。ブロッキング処理後、1000 r p m で1分間遠心分離を行った。

4. 検体との反応

測定対象であるヒト I g E を、2% 牛血清アルブミンを含む50 mM M O P S 緩衝液 (p H 7. 5) で所定濃度に調製して検体とし、各検体を10 μ L チップに供与し、気泡が入らないようにカバーガラスをかぶせた後、ハイブリダイゼーション容器に入れ室温で1時間反応させた。反応終了後、カバーガラスを除去し、S S C (0. 15 M N a C l - 0. 015 M クエン酸三ナトリウム溶液) で3回洗浄し、1000 r p m 1分間遠心分離を行った。

5. 担体に結合したヒト I g E の検出

C y 3 label 抗ヒト I g E 抗体 0.86 μ g/ml を10 μ L チップに供与し、気泡が入らないようにカバーガラスをかぶせた後、ハイブリダイゼーション溶液に入れ、室温で1時間反応させた。反応終了後、カバーガラスを除去し、S S C (0. 15 M N a C l - 0. 015 M クエン酸三ナトリウム溶液) で5回洗浄し、1000 r p m で1分間遠心分離を行った。

抗原抗体反応の度合いをGSI Lumonicus社製の共焦点レーザースキャナーでC y 3 label 抗ヒト I g E 抗体の量を測定した。測定結果を表1及び図3に示す。

表 1 抗ヒトIgE抗体量の測定結果

		I g E 濃度		
		0 IU/ml	0.7 IU/ml	7 IU/ml
固相の抗ヒト	0.1 mg/ml	5335	9950	11035
I g E 抗体濃	0.5 mg/ml	13957	21119	22578
度	1 mg/ml	20233	39233	45382

表 1 及び図 3 の結果から、本発明の方法によりヒト I g E の検出及び定量が可能となることが判る。

(実施例 2)

図 2 のプロセスに従い、抗 I g E 抗体を結合したダイヤモンド被覆担体を用いてアレルゲンの分析を行った。

1. ダイヤモンド被覆基体の活性化

カルボキシル基で覆われたダイヤモンド被覆基体を 20 mM N-ヒドロキシサクシンイミド及び 0.1 M 1-(3-ジメチルアミノ)プロピル 3-エチルカルボジイミドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6) に 30 分間浸漬した。その後、これを、滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、完全に水分が蒸発するように、遠心分離処理を行った。

2. アレルゲンの固定化

アレルゲン (ダニ抗原又はスギ抗原) を、50 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.5) で夫々 0.5 mg/ml の濃度となるように調整し、上記作製した活性化ダイヤモンド被覆基体に、日本レーザー電子製 GT-MASS スタンピングマシンを用いてスポットティングした。スポットティング終了後、50%ホルムアミドを含む加湿チャンバー内で、1 時間インキュベーションを行っ

た。

3. ブロッキング処理

2%牛血清アルブミンを含む50 mM MOPS緩衝液 (pH 7.5) 10 μ lを、ダイヤモンド被覆基体にアプライし、カバーガラスを気泡が入らないようにかぶせ、2時間ブロッキングを行った。

カバーガラスを取り除き、1 \times SSCで3回洗浄を行った後、遠心分離処理により、余分な水分を除去した。

4. 検体のアプライ

スギ又はダニに対してアレルギー反応を示すヒトの血清 (スギ陽性血清又はダニ陽性血清)、及び両者に対してアレルギー反応を示さないヒトの血清 (陰性血清) を検体とし、これら血清 10 μ lを夫々マイクロアレイ上にアプライし、カバーガラスを気泡が入らないようにかぶせ、4℃で1昼夜反応させた。反応後、カバーガラスを除去し、1 \times SSCで3回洗浄を行い、遠心分離処理により余分な水分を除去した。

5. 標識抗体との反応

4. 3 μ g/ml Cy3 label 抗IgE抗体、及び2% 牛血清アルブミンを含む、50 mM MOPS緩衝液 (pH 7.5) 10 μ lを、マイクロアレイ上にアプライし、カバーガラスを気泡が入らないようにかぶせ、3時間反応を行った。反応後、カバーガラスを除去し、1 \times SSCで3回洗浄後、遠心分離処理により余分な水分を除去した。

6. 結果

抗原抗体反応の度合いを、GSI Lumonicus社製の共焦点レーザースキャナーでCy3 label 抗ヒトIgE抗体由来の蛍光を測定した。陰性血清を検体として用いた場合の結果を図4に、スギ陽性血清を検体として用いた場合の結果を図5に、また、ダニ陽性血清を検体として用いた場合の結果を図6に

夫々示す。

図4の結果から、陰性血清を用いた場合は、マイクロアレイ上のスギ抗原及びダニ抗原固定化部位からは、Cy3 label 抗ヒトIgE抗体由来の蛍光が殆ど認められないことが、図5の結果から、スギ陽性血清を用いた場合は、マイクロアレイ上のスギ抗原固定化部位からはCy3 label 抗ヒトIgE抗体由来の蛍光が認められるのに対して、ダニ抗原固定化部位からはCy3 label 抗ヒトIgE抗体由来の蛍光が殆ど認められないことが、また、図6の結果から、ダニ陽性血清を用いた場合は、ダニ抗原固定化部位からCy3 label 抗ヒトIgE抗体由来の強い蛍光が認められることが、夫々判る。

尚、図6に於いて、マイクロアレイ上のスギ抗原固定化部位からもCy3 label 抗ヒトIgE抗体由来の弱い蛍光が若干認められているが、これは、当該ダニ陽性血清提供者に関して詳細な検査を行った結果、ダニのみでなく、スギに対しても若干の弱いアレルギー反応を示すこと、即ち、当該ダニ陽性血清は、ダニとスギに対してアレルギー反応を示す血清であったためである。

これらの結果から、本発明の方法によりアレルギーの原因となるアレルゲンの特定が可能となることが判る。また、特定されたアレルゲンに対する感受性の強さの程度を分析することが可能となることが判る。

産業上に利用可能性

本発明の生理活性物質固定化担体は、生理活性物質を高密度に固定化することができるので、生理活性物質を大量に消費することなく高い固定化効率を実現することができる。しかも、種々の表面電荷を示す生理活性物質であっても、高い固定化効率を保つことができる。

また、本発明の担体の製造方法によれば、前記担体を効率よく製造することが

できる。

さらに、本発明の試料中の対象成分を分析する方法は、前記担体を用いるので、各種対象成分を正確に分析することが可能である。

さらに、本発明のキットを用いることにより、試料中の対象成分の分析をより簡便に行うことができる。

特に、抗 I g E 抗体を固定化した担体は、アレルゲンと反応しアレルギーに深く関与する I g E を正確に分析することができるので、アレルギーの原因など各種免疫診断に有用である。

したがって、本発明は、医療分野での疾病診断、生化学、分子生物学分野での研究等の各分野で有用である。

請 求 の 範 囲

1. 生理活性物質が固定化された炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が担体表面に形成されている担体からなる生理活性物質固定化担体。
2. 生理活性物質が、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基を介してその表面に固定化されている請求項 1 に記載の生理活性物質固定化担体。
3. 生理活性物質が、該物質が有する官能基と炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基との結合により、炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の表面に固定化されている請求項 1 に記載の生理活性物質固定化担体。
4. 生理活性物質が有する官能基又は／及び炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層の官能基が、水酸基、カルボキシ基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基、アミノフェニル基及びエポキシ基からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものである請求項 3 に記載の生理活性物質固定化担体。
5. 生理活性物質が、生体に特有の作用を及ぼす物質又は生体由来タンパク若しくはペプチドである請求項 1 ～ 4 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体。
6. 生理活性物質が、抗原又は／及び抗体である請求項 1 ～ 5 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体。
7. 抗原又は／及び抗体が、腫瘍マーカー、ホルモン、環境ホルモン、微生物由来タンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原、レセプター、リガンド、アレルゲン、免疫グロブリン、レクチン、糖鎖、脂質、リポ多糖及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものである請求項 6 に記載の生理活性物質固定化担体。
8. 抗原又は／及び抗体が、アレルゲン、免疫グロブリン、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものである請求項 7 に記載の生理

活性物質固定化担体。

9. 炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が、結晶性炭素からなる層である、請求項1～8の何れかに記載の生理活性物質固定化担体。

10. 炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が、非晶性炭素からなる層である、請求項1～8の何れかに記載の生理活性物質固定化担体。

11. 結晶性炭素が、ダイヤモンド又はダイヤモンドライクカーボンである請求項9に記載の生理活性物質固定化担体。

12. 非晶性炭素が、グラファイト又は非晶性カーボンである請求項10に記載の生理活性物質固定化担体。

13. 官能基を有する炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が表面に形成された担体と、生理活性物質とを接触させることを特徴とする生理活性物質固定化担体の製造方法。

14. 炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成された担体表面に官能基を導入し、次いでこれと生理活性物質とを接触させることを特徴とする生理活性物質固定化担体の製造方法。

15. 官能基が、水酸基、カルボキシ基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基、アミノフェニル基及びエポキシ基からなる群から選ばれた1又は2以上のものである請求項13又は14に記載の生理活性物質固定化担体の製造方法。

16. 炭素乃至は金属又は半金属炭素化合物層が形成されている担体表面に固定化されてなる生理活性物質。

17. 請求項1～12の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を用いることを特徴とする、試料中の対象成分の分析方法。

18. 請求項1～12の何れかに記載の生理活性物質固定化担体と対象成分を含有する試料とを接触させ、当該担体表面に固定化された生理活性物質と試料中

の対象成分とから生成した複合体を分析することを特徴とする、請求項 17 に記載の試料中の対象成分の分析方法。

19. 担体表面に固定化された生理活性物質が、抗原又は抗体の何れかであり、試料中の対象成分が、当該生理活性物質に対する抗原又は抗体である請求項 17 又は 18 に記載の試料中の対象成分の分析方法。

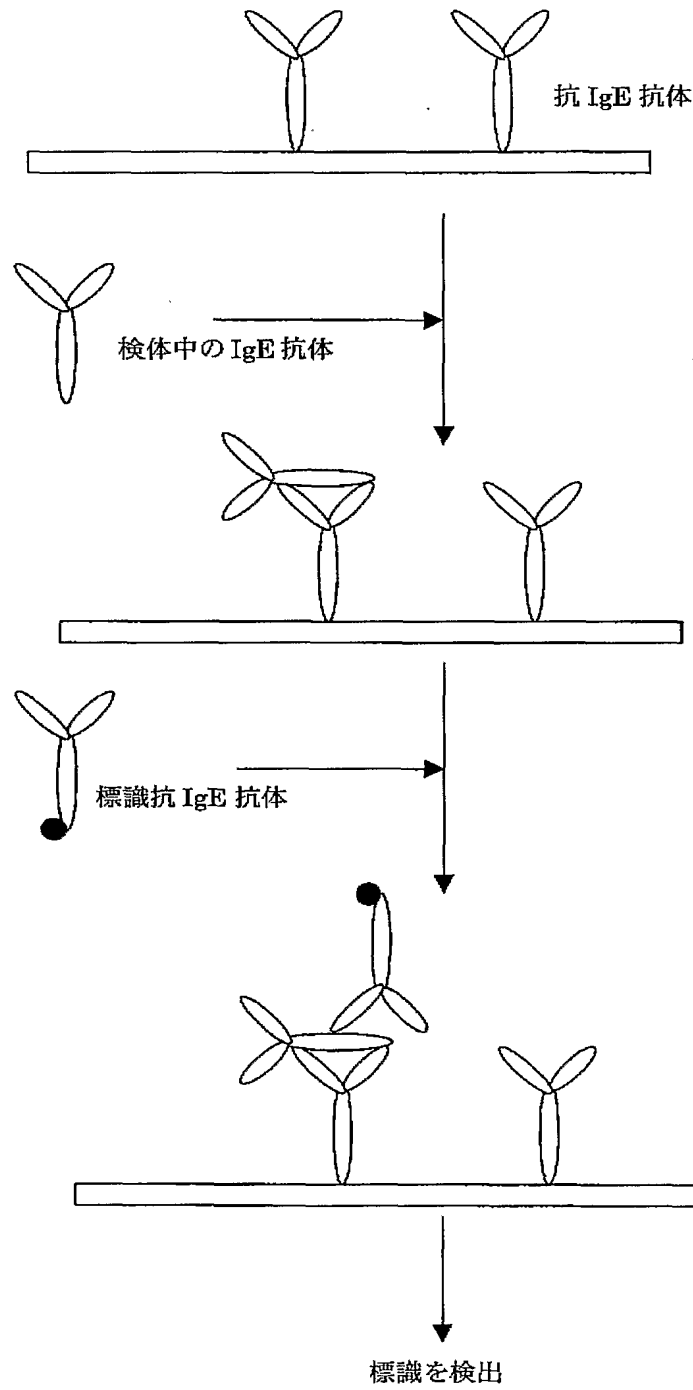
20. 抗原又は抗体が、腫瘍マーカー、ホルモン、環境ホルモン、微生物由来タンパク又はペプチド或いは糖鎖抗原、レセプター、リガンド、アレルゲン、免疫グロブリン、レクチン、糖鎖、脂質、リポ多糖及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものである請求項 19 に記載の試料中の対象成分の分析方法。

21. 抗原又は抗体が、アレルゲン、免疫グロブリン、及びこれらに対する抗体からなる群から選ばれた 1 又は 2 以上のものである請求項 20 に記載の試料中の対象成分の分析方法。

22. 請求項 1 ～ 12 の何れかに記載の生理活性物質固定化担体を含んでなる試料中の対象成分分析用キット。

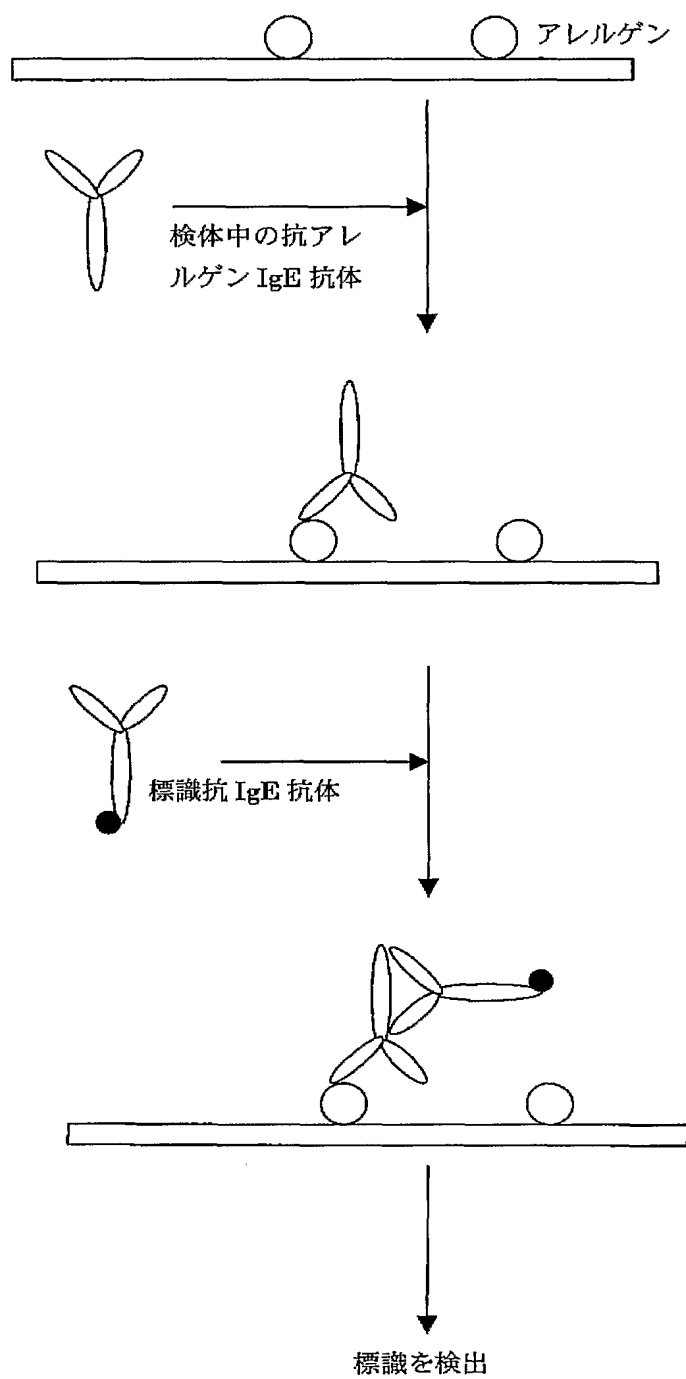
1 / 4

第 1 図

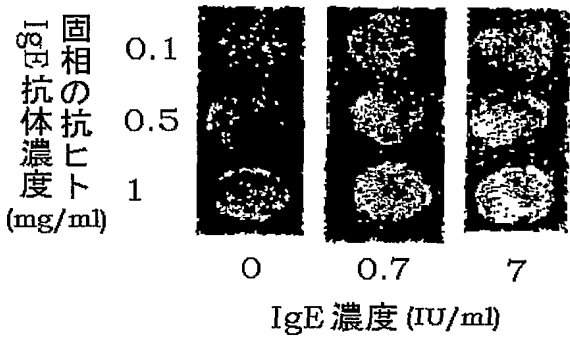


2 / 4

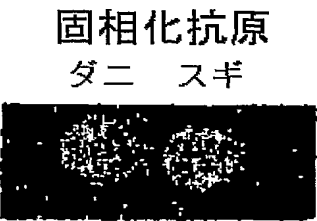
第 2 図



第 3 図



第 4 図



4 / 4

第 5 図

固相化抗原
ダニ スギ



第 6 図

固相化抗原
ダニ スギ



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/551, G01N33/553

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53-579

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-314714 A (Canon Inc.), 14 November, 2000 (14.11.00), Claims; Par. Nos. [0036] to [0038] (Family: none)	1-22
X	JP 8-240555 A (Kobe Steel, Ltd.), 17 September, 1996 (17.09.96), Claims; Par. Nos. [0006], [0073] to [0074] & US 5777372 A	1-22
X	JP 11-242031 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 07 September, 1999 (07.09.99), Claims (Family: none)	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 May, 2002 (29.05.02)Date of mailing of the international search report
11 June, 2002 (11.06.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04661

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 10-307139 A (Boehringer Mannheim GmbH.), 17 November, 1998 (17.11.98), Claims; Par. No. [0014] & EP 872735 A & US 6221674 A & DE 19715484 A	1-10, 13-22/ 11, 12
X/Y	JP 3-503679 A (Amersham International PLC), 15 August, 1991 (15.08.91), Claims & WO 89/08260 A & EP 378594 A	1-10, 13-22/ 11, 12
A	WO 00/22108 A (Toyo Kohan Co., Ltd.), 20 April, 2000 (20.04.00), & EP 1122309 A & JP 2000-575999 A	1-22
A	WO 99/40173 A (Toyo Kohan Co., Ltd.), 12 August, 1999 (12.08.99), & EP 1063286 A & CN 1295611 A & KR 2001040747 A	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/551, G01N33/553

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53-579

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2002年

日本国登録実用新案公報 1994-2002年

日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-314714 A(キャノン株式会社)2000.11.14 特許請求の範囲、【0036】-【0038】(ファミリーなし)	1-22
X	JP 8-240555 A(株式会社神戸製鋼所)1996.09.17 特許請求の範囲、【0006】、【0073】-【0074】 &US 5777372 A	1-22
X	JP 11-242031 A(大日本印刷株式会社)1999.09.07 特許請求の範囲(ファミリーなし)	1-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.05.02

国際調査報告の発送日

11.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



2 J

9 2 1 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 10-307139 A(ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーク) 1998.11.17 特許請求の範囲、【0014】 & EP 872735 A & US 6221674 A & DE 19715484 A	1-10, 13-22/ 11, 12
X/Y	JP 3-503679 A(アマーシャム・インターナショナル・ピーエルシ ー)1991.08.15 特許請求の範囲& WO 89/08260 A & EP 378594 A	1-10, 13-22/ 11, 12
A	WO 00/22108 A(東洋鋼板株式会社)2000.04.20 & EP 1122309 A & JP 2000-575999 A	1-22
A	WO 99/40173 A(東洋鋼板株式会社)1999.08.12 & EP 1063286 A & CN 1295611 A & KR 2001040747 A	1-22